

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian tentang peran pemberian vitamin E dalam media DMEM terhadap proliferasi sel ginjal fetus hamster yang dikultur primer merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan dan 4 kali ulangan.

Perlakuan :

- a. Kelompok P0: sel ginjal fetus hamster tanpa pemberian vitamin E (kontrol).
- b. Kelompok P1: sel ginjal fetus hamster yang diberi vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol) dengan konsentrasi 25 mM.
- c. Kelompok P2: sel ginjal fetus hamster yang diberi vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol) dengan konsentrasi 50 mM.
- d. Kelompok P3: sel ginjal fetus hamster yang diberi vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol) dengan konsentrasi 75 mM.
- e. Kelompok P4: sel ginjal fetus hamster yang diberi vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol) dengan konsentrasi 100 mM.
- f. Kelompok P5: sel ginjal fetus hamster yang diberi vitamin E ( $\alpha$ - tokoferol) dengan konsentrasi 125 mM.

### 3.2 Variabel Penelitian

Varibel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi : 1) variabel bebas, 2) variabel terikat dan 3) variabel terkendali. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan pemberian vitamin E ( *$\alpha$ -tocoferol*) untuk meningkatkan proliferasi sel ginjal dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 0  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 125  $\mu$ M; yang termasuk variabel terikat adalah proliferasi sel ginjal yang meliputi konfluenitas sel, viabilitas sel, dan abnormalitas sel; sedangkan variabel terkendali adalah hewan percobaan jenis hamster yang berumur 2 hari dan jenis kultur sel yang digunakan adalah sel ginjal.

### 3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Juni - November 2011.

### 3.4 Instrumen Penelitian

#### 3.4.1 Alat-Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi oven, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), kulkas, inkubator CO<sub>2</sub> 5%, sentrifus, tabung sentrifus, spuit, gunting, pinset, scapel, mikropipet 200  $\mu$ l dan 1000  $\mu$ l (SOCOREX), *yellow tip*, *blue tip*, petri disk, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, beaker glass, kain nilon (100 mm), filter single use (0,20  $\mu$ M; Sartorius, Mini Sart;1 6534), corong, aluminium foil, mikroskop inverted, haemocytometer, deck glass, pipet tetes,

hand counter, water bath, *well* sumuran 12 (USA, costor 3524), mortal dan martil, bunsen, korek api, masker, hand glove, penutup kepala, kertas label, karet, tissue.

### 3.4.2 Bahan-Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : sel ginjal fetus hamster yang berumur 2 hari, *Dulbecco's Modified Eagles Medium* with high glucose (DMEM, Gibco, Burlington, ON 12800-017), *Phosphat Buffer Saline* (PBS, Gibco 21600-051), tripsin (Gibco 15090), tripsin EDTA, *Fetal Bovine Serum* (FBS, 12003c), Penicillin dan Streptomycin (Meiji Indonesia), Fungizon (Gibco, 15290-0,8), Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol, Natur E), Hepes, Alkohol 70%, Aquades, kloroform, tipol, NaHCO<sub>3</sub>, DI steril.

## 3.5 Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Preparasi

Pada tahap preparasi yang perlu dilakukan adalah preparasi bahan dan pembuatan media kultur, preparasi alat dan sterilisasi, serta pengelompokkan perlakuan. Prosedur dalam tahap preparasi adalah sebagai berikut :

#### 3.5.1.1 Sterilisasi Alat-Alat Kultur

Sebelum penelitian dimulai alat-alat yang akan digunakan disterilisasi untuk menghindari kontaminasi dengan cara direndam dengan tipol selama 1 x 24 jam, kemudian dibilas sebanyak 21 kali pada air yang mengalir, pada bilasan terakhir dibilas dengan aquades. Dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C,

setelah kering semua peralatan dibungkus dengan aluminium foil. Peralatan gelas dan logam disterilisasi dalam oven dengan suhu 125°C selama 3 jam. Peralatan yang sifatnya plastik disterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C, tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

#### **3.5.1.2 Pembuatan Media Kultur**

Bahan-bahan ditimbang sesuai dengan ukuran yang digunakan. Untuk pembuatan 100 ml stok media DMEM, ditimbang media DMEM powder sebanyak 1,35 gram, 0,37 gram  $\text{NaHCO}_3$ , 0,238 gram hepes, 0,06 gram streptomycin, 0,01 gram penicillin, fungizon/ amphotericin B 100  $\mu\text{l}$ . Semua bahan-bahan dilarutkan sampai homogen, kemudian disaring dengan menggunakan filter single use (membran miliporus 0,20  $\mu\text{m}$ ). Cara kerja ini dilakukan dengan steril di LAF.

Media yang digunakan sebagai kultur sel ginjal fetus hamster adalah campuran media stock dengan 20 % suplementasi FBS. Sedangkan untuk *washing* sel menggunakan PBS dan medium non serum.

#### **3.5.1.3 Pembuatan Larutan Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)**

Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) merupakan larutan hidrofobik, sehingga harus dilarutkan dalam DMSO 0,2%. DMSO merupakan pelarut yang tidak karsinogen dan teratogen pada tikus atau kelinci, karena potensial toksisitasnya rendah. DMSO bereaksi cepat dengan sejumlah zat terutama dengan air, selain itu DMSO merupakan pemelihara sel pada temperatur rendah (Elzay, 1967).

### 3.5.1.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

Perlakuan kultur sel ginjal fetus hamster dikelompokkan menjadi 6 kelompok, yaitu:

- a. P0: sel ginjal fetus hamster + DMEM + 20% FBS yang tidak diberi vitamin E
- b. P1: sel ginjal fetus hamster + DMEM + 20% FBS + vitamin E dengan konsentrasi 25 $\mu$ M.
- c. P2: sel ginjal fetus hamster + DMEM + 20% FBS + vitamin E dengan konsentrasi 50 $\mu$ M.
- d. P3: sel ginjal fetus hamster + DMEM + 20% FBS + vitamin E dengan konsentrasi 75 $\mu$ M.
- e. P4: sel ginjal fetus hamster + DMEM + 20% FBS + vitamin E dengan konsentrasi 100 $\mu$ M.
- f. P5: sel ginjal fetus hamster + DMEM + 20% FBS + vitamin E dengan konsentrasi 125 $\mu$ M.

### 3.5.2 Kegiatan Penelitian

#### 3.5.2.1 Isolasi Sel Ginjal Hamster

Hamster didislokasi kemudian dibedah. Organ ginjal hamster diambil, diwashing dalam PBS sebanyak 3 kali. Ginjal dicacah sampai halus dalam 1 ml tripsin. Setelah itu diinkubasi selama 20 menit. Kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifus dengan disaring menggunakan kain nilon dan ditambah dengan 2

ml DMEM 0% untuk menghilangkan tripsinnya. Disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit.

Supernatan dibuang, pellet diambil, dan ditambah 3 ml DMEM 0%. Disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet diambil dan ditambah 3 ml DMEM 20%. Disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, disisakan 1 ml pellet, pellet dipipeting (dihomogenisasi), pellet diambil 1,5 ml dan dibagi dalam well sumuran 12 yang sudah berisi media tanam 20% dan vitamin E dengan masing-masing konsentrasi. Kemudian diinkubasi selama 4 hari, setelah itu dilakukan pengamatan proliferasi sel ginjal fetus hamster untuk mengetahui pengaruh vitamin E.

#### **3.5.2.2 Perlakuan Pemberian Vitamin E**

Perlakuan pemberian vitamin E dilakukan pada saat kultur primer. Vitamin E ditambahkan ke dalam media tanam 20% sesuai dengan kelompok perlakuan. Suspensi sel hasil isolasi dimasukkan ke dalam *well* yang sudah berisi media tanam dan vitamin E. Sel diinkubasi selama 4 hari dalam inkubator dengan suhu 37°C dengan 5% CO<sub>2</sub> dan diamati 2 hari sekali untuk melihat pengaruh vitamin E terhadap sel.

#### **3.5.2.3 Pengamatan Proliferasi Sel Ginjal Fetus Hamster**

##### **1. Pengamatan Konfluen Sel Ginjal Fetus Hamster**

Sel dikatakan konfluen apabila sel tersebut telah berkembang dan memenuhi petridisk, untuk mengamati konfluennya sel ginjal hamster ini

digunakan mikroskop inverted. Setelah diinkubasi selama 4 hari, sel diamati di bawah mikroskop. Kemudian dicatat hasilnya, sel tersebut mencapai konfluen berapa persen.

Kriteria dari pengukuran konfluen sel ini mencakup persentase sel dalam mencapai konfluen. Setelah 4 hari hasil pengamatan tersebut dicatat hasilnya dengan menggunakan persentase 0% apabila sel belum melekat dalam sumuran *Well*, 25% ketika sel sudah memenuhi satu perempat sumuran *well*, 50% apabila sel sudah memenuhi setengah dari sumuran *well*, 75 % apabila sel telah memenuhi tiga perempat sumuran *well* dan 100% apabila sel telah memenuhi seluruh sumuran *well* (Fresney, 2002).

## **2. Pengamatan Viabilitas Sel Ginjal Fetus Hamster**

Pengamatan viabilitas ginjal fetus hamster ini adalah untuk melihat tingkat perkembangan sel dengan menggunakan Tripian Blue 0.4% dilakukan menurut metode Trenggono (2009). Tripian blue tidak mengubah integritas membran plasma dan memperlambat proses kematian sel. Tripian blue juga memperkecil jumlah sel dan memfasilitasi identifikasi sel yang akan dilihat dengan mikroskop (Bolt, 2001).

Sel hasil kultur dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali kemudian diberi tripsin EDTA sebanyak 1 ml dan diinkubasi selama 20 menit. Setelah itu, dikocok-kocok agar sel lepas dari plate. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan plate dibilas dengan DMEM 0% agar sel yang tersisa di plate bersih. Disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dibuang, pellet

ditambah dengan 3 ml DMEM 20%. Disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Supernatan dibuang, pellet disisakan 1 ml. Suspensi sel diambil 100µl dan ditambah dengan 100µl tripan blue dimasukkan ke dalam tabung eppendorf untuk menghitung viabilitas sel.

Hemositometer dengan gelas penutup dibersihkan dan diletakkan pada mikroskop untuk mencari garis hemositometer terlebih dahulu. Setelah garis ditemukan, ditetaskan suspensi sel pada hemositometer dari tepi gelas penutup, sehingga cairan masuk di bawah gelas penutup. Didiamkan selama 1-2 menit, tidak boleh terlalu lama, sel yang rusak akan menyerap warna. Sel-sel yang rusak bersifat *non-viabel*. Diletakkan di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Kemudian jumlah sel yang berwarna dan jumlah seluruh sel dihitung. Jumlah sel yang tidak berwarna menunjukkan viabilitas sel, perhitungan viabilitas sel dilakukan dengan menggunakan rumus (Besta, 2004) :

$$\% \text{ viabilitas sel} = (\sum \text{sel yang hidup} / \sum \text{sel yang hidup dan mati}) \times 100$$

### 3. Pengamatan Abnormalitas Sel Ginjal Fetus Hamster

Sel hasil kultur ketika pengamatan dibedakan menjadi sel mati dan sel hidup. Sel yang hidup dibedakan lagi antara sel yang sehat (normal) dengan sel yang tidak sehat (abnormal). Sel dikatakan abnormal jika sel tersebut berukuran melebihi ukuran sel normal dan mengalami perubahan bentuk dari asalnya, terkontaminasi oleh bakteri dan jamur (Djati, 2006). Abnormalitas yang sering muncul pada kultur sel ditandai dengan adanya sel raksasa (*giant cell*) yaitu sel



yang volume senyawa, DNA, RNA, serta massa protein bertambah hingga 20-200 kali lipat dari sel normal (Freshney, 2000).

Kriteria dari pengukuran abnormalitas sel ini mencakup persentase sel. Sel abnormal dihitung dalam kotak tengah bilik hitung dan empat kotak di tepi sudut. Sel dihitung secara terpisah antara sel yang hidup normal dan hidup abnormal. Perhitungan abnormalitas sel dilakukan dengan menggunakan rumus :

Abnormalitas sel =  $(\Sigma \text{ sel yang hidup abnormal} / \Sigma \text{ sel yang hidup}) \times 100\%$

### 3.6 Analisis Data

Data hasil pengamatan yang meliputi konfluenitas, viabilitas, dan abnormalitas sel ginjal fetus hamster dianalisis dengan uji ANAVA tunggal. Jika hasil analisis tersebut menunjukkan perbedaan yang signifikan maka dilakukan uji lanjut dengan  $\alpha=5\%$ .

Hanafiah (2010), menjelaskan bahwa uji lanjut ditentukan setelah mengetahui nilai koefisien keragaman (KK). KK merupakan koefisien yang menunjukkan derajat ketelitian hasil yang diperoleh dari suatu percobaan. Nilai KK yang semakin kecil menunjukkan derajat ketelitian yang semakin tinggi dan validitas kesimpulan yang diperoleh dari percobaan tersebut juga tinggi.

Penggunaan uji lanjut pada parameter penelitian ini dilakukan berdasarkan nilai KK dengan ketentuan jika nilai KK besar (minimal 10% pada kondisi homogen atau 20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang digunakan adalah uji Duncan. Jika nilai KK sedang (antara 5-10% pada kondisi homogen atau 10-20% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang digunakan adalah uji BNT (Beda Nyata

Terkecil). Jika nilai KK kecil (maksimal 5% pada kondisi homogen atau 10% pada kondisi heterogen), uji lanjut yang digunakan adalah uji BNJ (Beda Nyata Jujur) (Hanafiah, 2010). Berdasarkan ketentuan tersebut, pada penelitian ini digunakan uji lanjut UJD 5% untuk mengetahui konfluenitas dan abnormalitas sel ginjal fetus hamster, sedangkan BNT 5% digunakan untuk mengetahui viabilitas sel ginjal fetus hamster.

